

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2005 年 9 月 9 日 (09.09.2005)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2005/082389 A1

(51) 国際特許分類: A61K 35/78, A23L 1/20,
1/30, A61K 38/55, 45/00, A61P 35/04

(21) 国際出願番号: PCT/JP2005/003130

(22) 国際出願日: 2005 年 2 月 25 日 (25.02.2005)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2004-054554 2004 年 2 月 27 日 (27.02.2004) JP

つくば研究開発センター内 Ibaraki (JP). 福田 洋一 (FUKUDA, Yoichi) [JP/JP]; 〒5988540 大阪府泉佐野市住吉町 1 番地 不二製油株式会社 阪南事業所内 Osaka (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 不二製油株式会社 (FUJI OIL COMPANY, LIMITED) [JP/JP]; 〒5420086 大阪府大阪市中央区西心斎橋 2 丁目 1 番 5 号 Osaka (JP).

(71) 出願人 および

(72) 発明者: 小林 浩 (KOBAYASHI, Hiroshi) [JP/JP]; 〒4313192 静岡県浜松市半田山 1 丁目 2 0 番 1 号 浜松医科大学 産婦人科 Shizuoka (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 吉田 隆治 (YOSHIDA, Ryuji) [JP/JP]; 〒3002436 茨城県筑波郡谷和原村絹の台 4 丁目 3 番地 不二製油株式会社

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:
— 国際調査報告書

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: CANCER METASTASIS INHIBITORY COMPOSITION

(54) 発明の名称: 癌転移抑制組成物

(57) Abstract: It is intended to provide a cancer metastasis inhibitor which shows a potent effect of inhibiting cancer metastasis comparable to bikunin while showing no side effect and can be obtained in a large amount at a low cost. As the results of studies on the cancer metastasis inhibitory effect by the administration of soybean Kunitz trypsin inhibitor (KTI), a potent activity of inhibiting cancer metastasis is found out. Since KTI is contained in soybean whey, which discharged in a large amount in preparing separated soybean protein and so on from soybean, and soybean whey can be obtained at a low cost, KTI extracted and purified in a large amount therefrom is clinically applicable.

(57) 要約: ビクニンのような強力な癌転移抑制作用を示し、副作用がなく、かつ安価に大量に入手が可能な癌転移抑制剤を提供する。大豆クニッツ型トリプシンインヒビター (KTI) の投与による癌転移抑制効果を調べたところ、強力な癌転移抑制活性を見出すに到った。KTI は大豆から分離大豆蛋白などを調製する際に大量に排出される大豆ホエー中に多く含まれており、大豆ホエーは安価に入手できるため、これを原料として大量に抽出・精製すれば臨床応用が可能である。



WO 2005/082389 A1

明 細 書

癌転移抑制組成物

技術分野

[0001] 本発明は、抗癌作用ではなく癌の転移を抑制する作用を有する組成物に関する。

背景技術

[0002] 我が国では、1981年以降、癌が死因の1位を占め続けており、全死因の1／4は癌によるものである。癌が死亡原因の第1位を占めている現在、癌撲滅が人類にとっての最大の課題となっている。現在、癌全体の治癒率は50％であり、固形腫瘍では進行癌の治癒率は現在でも10％しかない。癌患者が死亡するのは癌が実質臓器に転移するからであり、有効な癌転移抑制剤が開発されれば癌患者、特に進行癌患者の予後は飛躍的に向上する。一方で癌転移を抑制するには長期間摂取を継続することが必要であるため、全く毒性を有さず、安価に提供できることが理想である。

[0003] 発明者の一人は先の研究によりヒト羊水中から癌転移を特異的に抑制する生理的物質ビクニンを発見し、ビクニンを用いた動物実験により副作用なく良好な生存率を得たことを報告した(非特許文献1)。しかしビクニンを癌患者に長期間投与するためには大量のヒト羊水を集め、これからビクニンを精製しなければならないため、非常に高価となり実用的ではないし、癌患者の経済的負担も大きい。

[0004] 一方、大豆の中にはトリプシンインヒビターが含まれており、特に分離大豆蛋白を製造する際に副生される大豆ホエー中に比較的豊富に含まれる。大豆トリプシンインヒビターは、クニッツ型トリプシンインヒビター(「KTI」と称する。)とボーマンバーク型トリプシンインヒビター(「BBI」と称する。)とに種別される(非特許文献2)。そして大豆ホエーの画分には抗皮膚癌効果を有すること(特許文献1)やKTIには制癌作用増強効果を有すること(特許文献2)が報告されている。

しかしながら、これらの報告はいずれも大豆トリプシンインヒビターが癌自体の発生を抑制する制癌剤としての作用や、他の制癌剤との併用による制癌作用の増強作用について開示しているのみである。かかる制癌作用は癌細胞に対する直接的な増殖抑制作用や殺細胞作用を示しているだけであるので、大豆トリプシンインヒビターに

すでに形成した微小転移巣が増大し、転移・再発を発症するのを抑制することは全く開示されていない。

[0005] 特許文献1:特開平6-145061号公報

特許文献2:特開平7-10773号公報

非特許文献1:Kobayashi H., Shinohara H., Gotoh J., Fujie M., Fujishiro S., Terao T.: Anti-metastatic therapy by urinary trypsin inhibitor in combination with an anti-cancer agent. Br. J. Cancer 72: 1131-1137, 1995.

非特許文献2:池中徳治:豆科植物プロテアーゼ・インヒビターの構造と阻害機構, 蛋白質 核酸 酵素, Vol.27, No.12, 1738-1746, 1982.

発明の開示

発明が解決しようとする課題

[0006] 以上のように、ビクニンのような強力な癌転移抑制作用を示し、かつ安価に大量に入手が可能な癌転移抑制剤は未だ知られていない。すなわち本発明は、かかる癌転移抑制剤を提供することを課題とする。

課題を解決するための手段

[0007] 本発明者らは、上記の課題に鑑み、ビクニンの分子構造についてホモロジー検索を行ったところ、ビクニンの構造が大豆由来のクニッツ型トリプシンインヒビター(以下、「KTI」と称する)の構造と極めて高い相同性を有することを確認した。そこでKTIの投与による癌転移抑制効果を調べたところ、KTIに強力な癌転移抑制活性を見出すに到った。KTIは大豆から分離大豆蛋白などを調製する際に大量に排出される大豆ホエー中に多く含まれており、大豆ホエーは安価に入手できるため、これを原料として大量に抽出・精製すれば臨床応用が可能であり、健康食品への応用も可能である。

[0008] 即ち、本発明が提供するものは、

- 1) 大豆クニッツ型トリプシンインヒビターを有効成分とする癌転移抑制組成物、
- 2) 大豆クニッツ型トリプシンインヒビターの供給源として大豆ホエーを含む前記1)記載の組成物、
- 3) 大豆クニッツ型トリプシンインヒビターの供給源として大豆ホエーからのトリプシンイ

- ンヒビター濃縮物を含む前記1)記載の組成物、
- 4)大豆ホエーからのトリプシンインヒビター濃縮物が、可及的にボーマンバーク型トリプシンインヒビターが分離除去されたものである前記3)記載の組成物、
- 5)食品または医薬である前記1)記載の組成物、
- 6)癌転移の予防もしくは抑制用と表示された食品、又は間接的表示により癌転移の予防もしくは抑制用と表示されているに等しい食品である前記5)記載の食品、
- 7)前記1)記載の組成物に抗癌成分又は／及び癌予防成分を含む、抗癌もしくは／及び癌予防並びに癌転移抑制組成物、
- 8)前記1)記載の組成物と、抗癌成分もしくは／及び癌予防成分を含む組成物とを組み合わせる、抗癌もしくは／及び癌予防並びに癌転移抑制用組合せ組成物、
- 9)大豆クニッツ型トリプシンインヒビターの、癌転移抑制組成物製造における使用、である。

発明の効果

- [0009] 本発明によれば、従来十分に活用されていなかった大豆ホエーから大豆KTIを精製することにより、強力な癌転移抑制作用を示しかつ副作用がなく臨床応用が可能な癌転移抑制組成物を安価に大量に提供することができる。したがって、比較的早期がんであっても転移する可能性を否定できない症例や、すでに転移巣が形成された癌患者であってもそれ以上の癌転移を抑制するためには極めて有用であり、医薬や機能性食品として長期の投与が可能である。

発明を実施するための最良の形態

- [0010] (KTIの調製方法)

本発明の組成物の有効成分であるKTIは、主に大豆中のホエー成分に含まれているため、その供給源としては大豆ホエーを本発明の組成物に含むことが好ましい。さらに供給源としては大豆ホエーからのトリプシンインヒビター濃縮物が好ましい。さらにトリプシンインヒビター濃縮物は可及的にBBIが分離除去されたものがより好ましい。上記供給源の調製方法は公知の方法を使用すればよく、特に限定されないが、例えば以下のようにして調製するのが好適である。

[0011] まず大豆ホエーは、大豆トリプシンインヒビターを含む大豆ホエーが使用できる。すなわち、それが生じる過程で大豆トリプシンインヒビターが失活するほどの熱履歴を受けていないものが好ましい。

大豆ホエーは、大豆から分離大豆蛋白、あるいは濃縮大豆蛋白を製造する過程で副生するものであり、大豆モラセスとも呼ばれる。熱履歴の少ない大豆ホエーは、例えば、低変性脱脂大豆を水によって中性付近で抽出後オカラ成分を除去した脱脂豆乳を、等電点付近(例えばpH4.5付近)で大豆蛋白質を凝集沈殿させて除いた溶液として得ることができる。

[0012] 工業的に分離大豆蛋白を製造する過程で副生される大豆ホエーは、多量に品質の安定した原料として利用することができるので好都合であり、通常このホエーは典型的には、固形分が約3%程度で、その固形分組成(以下において「dry%」ともいう)は粗蛋白質20%、灰分20%、糖質60%程度で構成されており、脱脂大豆からの水抽出倍率が変わっても大豆ホエーの固形分組成の変動は殆ど無い傾向にある。そして、固形分が3%程度であれば、大豆トリプシンインヒビターが活性として5unit/ml程度含まれている。したがって大豆ホエーとしては少なくとも3unit/ml以上の活性を有するものが本発明に好適に用いることができる。なお、本発明における大豆トリプシンインヒビター活性の測定法はA. O. C. S. の公定法に基づいたBAPA法を用いて定量する。

[0013] 次に、大豆トリプシンインヒビター濃縮物は、大豆ホエーよりトリプシンインヒビターを分離することにより得られ、種々の方法を用いることができるが、塩析により沈殿として回収する方法が容易である。例えば固形分が3%の大豆ホエーに対しては、硫酸ナトリウムを14%になるように添加し、pHを1.7〜5.2好ましくは2.7〜4.8の範囲に保持する事で、トリプシンインヒビターを凝集沈殿として回収できる。

別の方法として特開2004-313170号公報に記載の方法を用いることができる。すなわち、塩を添加する代わりに大豆ホエーをトリプシンインヒビターが失活しない温度で濃縮し、固形分を30〜50重量%程度まで高め、pHを酸性条件下、好ましくはpHを1.7〜5.2、より好ましくは2.7〜4.8の範囲に保持する事で、内在の塩により塩析され、トリプシンインヒビターを凝集沈殿として回収できる。本方法は脱塩をしなくと

も良い点で利点を有する。濃縮手段は公知の手段を利用できるが、減圧下で濃縮すると温度上昇を防ぎ効率良く濃縮できる。

またさらに別の方法として特願2004-22933号明細書に記載の方法も用いることができる。すなわち上記の塩析と濃縮を組合せて回収する方法であり、大豆ホエーを固形分濃度10〜30重量%に濃縮し、濃縮大豆ホエーに対し、3重量%以上の加塩を行い、酸性条件下で析出する凝集沈殿物を回収することで得られる。

以上により得られた大豆トリプシンインヒビター濃縮物はKTIとしても濃縮されているため、これをKTI濃縮物として本発明に利用可能である。

[0014] さらに、大豆トリプシンインヒビター濃縮物のKTIの力価を上げるためには、トリプシンインヒビター濃縮物からBBIを可及的に分離除去し、KTIを高濃度化することが好ましい。KTIとBBIの分離方法も公知の方法を用いることができるが、分離に際しては、トリプシンインヒビターのクニッツ型トリプシンインヒビター(KTI)はpH4.5の等電点を、ボーマンバーク型トリプシンインヒビター(BBI)はpH4.2の等電点を有するものの、大豆ホエーをそのまま夫々の等電点でpHを調整して等電点沈殿を試みても目的物質の凝集沈殿は生じない、或いは極めて微量である点に留意する必要がある。そこで特開2004-313170号公報に記載の以下の分離方法が好適である。

[0015] トリプシンインヒビターの凝集沈殿物に加水しpH2.0〜4.8、好ましくはpH3.0〜pH4.4の範囲で一部溶解を行い更に固液分画することができる。この固液分画により得られる液体部がBBI濃縮物、固体部物がKTI濃縮物とすることができる。これは加水により塩濃度が、濃縮ホエーのそれより低くなるため、BBIは再溶解してくるのに対してKTIは溶解せず、両者を上清と沈殿とに分画することができるのである。加水の程度は凝集沈殿物(含水物)に対し1.5倍以上、好ましくは2から10倍、もっとも好ましくは2.5から4倍が好ましい。得られたKTIはそのまま、あるいは中性で再溶解後に、水を含んだまま、あるいは乾燥して使用する事が出来る。

[0016] 本発明の癌転移抑制組成物は、上記KTIを有効成分として含有するものである。本発明の組成物は食品または医薬である。医薬品として投与される場合はそれ単独で又は薬学的に許容される担体と混合して各種の投与形態に調製して投与される。いずれの場合もこれらは適当な薬学的に許容される担体を用いて通常の方法に従い

製剤化し、癌転移抑制剤とされる。ここで用いられる担体としては通常の薬剤に汎用される各種のもの、例えば充填剤、増量剤、結合剤、崩壊剤、界面活性剤、滑沢剤等の希釈剤乃至賦形剤等を例示できる。

[0017] 本発明の癌転移抑制剤を、ヒトを含む哺乳動物の癌の転移の抑制の目的で使用する際の投与単位形態は特に限定されず、治療目的に応じて適宜選択でき、具体的には錠剤、丸剤、散剤、液剤、懸濁剤、乳剤、顆粒剤、カプセル剤、坐剤、注射剤、軟膏剤、貼付剤等を例示できる。

[0018] 錠剤の形態に成形するに際しては、担体として例えば乳糖、白糖、塩化ナトリウム、ブドウ糖、尿素、デンプン、炭酸カルシウム、カオリン、結晶セルロース、ケイ酸等の賦形剤、水、エタノール、プロパノール、単シロップ、ブドウ糖液、デンプン液、ゼラチン溶液、カルボキシメチルセルロース、セラック、メチルセルロース、リン酸カリウム、ポリビニルピロリドン等の結合剤、乾燥デンプン、アルギン酸ナトリウム、カンテン末、ラミナラン末、炭酸水素ナトリウム、炭酸カルシウム、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル類、ラウリル硫酸ナトリウム、ステアリン酸モノグリセリド、デンプン、乳糖等の崩壊剤、白糖、ステアリン酸、カカオバター、水素添加油等の崩壊抑制剤、第4級アンモニウム塩基、ラウリル硫酸ナトリウム等の吸収促進剤、グリセリン、デンプン等の保湿剤、デンプン、乳糖、カオリン、ベントナイト、コロイド状ケイ酸等の吸着剤、精製タルク、ステアリン酸塩、ホウ酸末、ポリエチレングリコール等の滑沢剤等を使用できる。更に錠剤は必要に応じ通常の剤皮を施した錠剤、例えば糖衣錠、ゼラチン被包錠、腸溶被錠、フィルムコーティング錠、多層錠等とすることができる。

[0019] 丸剤の形態に成形するに際しては、担体として例えばブドウ糖、乳糖、デンプン、カカオ脂、硬化植物油、カオリン、タルク等の賦形剤、アラビアゴム末、トラガント末、ゼラチン、エタノール等の結合剤、ラミナラン、カンテン等の崩壊剤等を使用できる。

[0020] カプセル剤は、本有効成分を上記で例示した各種の担体と混合し、硬質ゼラチンカプセル、軟質カプセル等に充填して調製される。

[0021] 坐剤の形態に成形するに際しては、担体として例えばポリエチレングリコール、カカオ脂、ハードバター、高級アルコールのエステル類、ゼラチン、半合成の例えばエステル交換法により得たグリセライド等を使用できる。

- [0022] 注射剤として調製される場合、液剤、乳剤及び懸濁剤は殺菌され、且つ血液と等張であるのが好ましく、これらの形態に成形するに際しては、希釈剤として例えば水、乳酸水溶液、エチルアルコール、プロピレングリコール、エトキシ化イソステアリルアルコール、ポリオキシ化イソステアリルアルコール、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル類等を使用できる。尚、この場合等張性の溶液を調製するに十分な量の食塩、ブドウ糖或いはグリセリンを医薬製剤中に含有せしめてもよく、また通常の溶解補助剤、緩衝剤、無痛化剤等を添加してもよい。
- [0023] 軟膏剤、例えばペースト、クリーム及びゲルの形態に調製する際には、希釈剤として例えば白色ワセリン、パラフィン、グリセリン、セルロース誘導体、ポリエチレングリコール、シリコン、ベントナイト等を使用できる。
- [0024] 更に上記各製剤には必要に応じて着色剤、保存剤、香料、風味剤、甘味剤等や他の医薬品を配合してもよい。
- [0025] 本発明の癌転移抑制剤中に含まれるKTIの量は特に限定されず1日の投与量に併せて適宜選択すればよいが、通常、製剤中1〜90重量%とすることができる。
- [0026] 本発明癌転移抑制剤の投与方法は特に限定されず、各種製剤形態、患者の年齢、性別その他の条件、患者の症状の程度等に応じて決定される。例えば錠剤、丸剤、散剤、液剤、懸濁剤、乳剤、顆粒剤及びカプセル剤は経口投与される。坐剤は直腸内投与される。注射剤は単独で又はブドウ糖、アミノ酸等の通常の補液と混合して静脈内投与され、更に必要に応じ単独で動脈内、筋肉内、皮内、皮下もしくは腹腔内投与される。軟膏剤は、皮膚、口腔内粘膜等に塗布される。
- [0027] 本発明癌転移抑制剤の有効成分の投与量は、用法、患者の年齢、性別その他の条件、疾患の程度、目的等により適宜選択でき、特に限定されない。通常、KTIの量が0.2〜30g／日程度の範囲となる量を目安とするのがよいが、かかる上限と下限を超える範囲を設定することを妨げない。これら本発明癌転移抑制剤は1日に1回又は2〜4回程度に分けて投与することができる。
- [0028] 本発明の癌転移抑制剤が適用できる癌の種類は特に限定されないが、例えば肺癌、卵巣癌、悪性黒色腫、子宮癌、小腸・大腸癌、乳癌、線維肉腫、白血病等の悪性腫瘍の転移抑制剤として使用することができる。

[0029] 上記KTIは、強力な癌の転移抑制作用を有するものであるが、伝統的な食品である大豆から得られる成分であるので、該KTIを有効成分として各種食品に配合し、癌転移抑制食品とすることも可能である。各種食品への添加量は上記目安量と同等の量を食品で摂取できるように調製してもよいし、比較的早期の癌の場合は予防的に上記目安量未満の量を摂取できるようにしてもよい。食品は特に限定されることはなく、クリーム等の水中油型乳化食品；マーガリン等の油中水型乳化食品；食用油；茶系飲料、清涼飲料、乳飲料等の飲料；牛乳、チーズ、ヨーグルト等の乳製品；豆乳、発酵豆乳、大豆蛋白飲料、豆腐、納豆、油揚げ、厚揚げ、がんもどきなどの大豆製品；ハンバーグ、ミートボール、唐揚げ、ナゲットなどの肉加工品、各種惣菜類、焼き菓子、チョコレート、ケーキ、冷菓、シリアル、飴、ガム、タブレット等の菓子類；食パン、菓子パン、ドーナツ等のパン類；米飯、寿司、餅等の米飯類など、様々な食品に適用できる。

またKTIは容易に食品中の含有量を測定できるので、これを有効成分（関与成分）として食品の本体又は食品の包装、容器、ラベル、広告、パンフレット等に、「癌転移抑制作用を有するため癌転移の予防や抑制に適する旨」、「KTIが有効成分として含まれる旨」、「KTIの有効摂取量」等を直接的に表示した、特定保健用食品等の健康用途の食品にもすることができる。もちろん、かかる直接的表示がなされなくとも、その食品を摂取すれば癌転移の予防や抑制に効果があることをイメージさせるような間接的な表示にし、かかる効果が表示されているに等しい健康用途の食品も本発明には包含される。

[0030] 本発明の癌転移抑制組成物には、ビクニンなどの他の癌転移抑制作用を示す有効成分を併用することが所望により可能である。

また、抗癌成分又は／及び癌予防成分を併用して含有させることにより、発癌から癌の増殖、癌の転移まで総合的に抑制する、1つの抗癌もしくは／及び癌予防並びに癌転移抑制組成物とすることが可能である。

さらに、本発明の癌転移抑制組成物と、抗癌成分もしくは／及び癌予防成分を含む組成物とをそれぞれセットにして組み合わせることにより、抗癌もしくは／及び癌予防並びに癌転移抑制用組合せ組成物とすることも可能である。

抗癌成分又は／及び癌予防成分の例としては特に限定されない。組成物が食品の場合は、食品への添加が許容されている成分、例えば大豆オリゴ糖、マンノオリゴ糖などのオリゴ糖類、ビフィズス菌や乳酸菌等の有用微生物、イソフラボン、カテキン、ケルセチン、アントシアニン、クロロゲン酸等のポリフェノール類、大豆サポニン、キライサポニン、人参サポニン等のサポニン類、キチンキトサン、フコイダン、 β -グルカン、マンナン、水溶性大豆多糖類等の多糖類、 α -カロチン、 β -カロチン、ルテイン、 α -トコフェロール、L-アスコルビン酸等のビタミン類、大豆ペプチド、乳ペプチド、コラーゲンペプチド等のペプチド類、リコピン、ゴマリグナン、アスタキサンチン、 β -クリプトキサンチン等のカルテノイド類、亜鉛、リモネン、モモルデシチン、チャランチン、セサミノール、レートリル、イソチオシアナート、クルクミン、プロポリス、コエンザイムQ10、大豆蛋白質などから選択される1種以上を使用できる。

また、組成物が医薬の場合は、上記成分に加え、薬学的に許容される成分を特に限定なく使用できる。

[0031] 従来の制癌剤は癌患者の癌細胞に直接作用させることにより、癌細胞を殺す働きを有するものの、癌細胞を全滅させることは困難であり、1個でも癌転移活性を有する癌細胞が残っていれば、他の組織への癌転移が生じうるため、癌の転移まで抑制することができない。また癌細胞と共に正常な細胞にまで影響を与える可能性がある。本発明の癌転移抑制剤にはこのような殺細胞作用はなく、癌細胞の癌転移活性を抑制するものであるため、かかる制癌剤の過剰投与・長期投与による人体への負担も軽減でき、癌治療・予防の根本的解決を図りうる。

[0032] 以下に実施例を記載するが、この発明の技術思想がこれらの例示によって限定されるものではない。

実施例

[0033] [製造例1]大豆ホエーの調製

低変性脱脂大豆に10倍量の温水を加え、pHを7.0に維持しつつ1時間攪拌下で抽出を行った。デカンターにて不溶成分であるオカラを除去し、脱脂豆乳液を得た。脱脂豆乳液に濃塩酸を加えpH4.5とし、析出した大豆蛋白質の沈殿を分離し、大豆ホエーを得た。

[0034] [製造例2] KTIおよびBBIの調製

製造例1で得た大豆ホエー200kg(乾物固形分3.0重量%、pH4.6、総トリプシンインヒビター力価960,000unit、粗たん白含有量20.3dry%、灰分20.1dry%、糖質59.6dry%)を大川原製作所製エバポール(CEP-L型)にて大豆ホエーの蒸発温度50℃、加熱温度80℃の条件で減圧濃縮して乾物固形分42.2重量%、総トリプシンインヒビター力価930,000unit(66unit/g)の濃縮ホエーを14,000g(付着等で約200gロス)得た。

濃縮ホエーを15℃に冷却してリン酸によりpH4.0に調整し10℃にて3時間静置した後遠心分離(1,500G×10分)を行い上清と沈殿に分けた。分離した上清は12,850g得られ乾物固形分は重量41.3%、総トリプシンインヒビター力価110,500unit(8.6unit/g)となり、沈殿は1,150g得られ、乾物固形分は52.3重量%、総トリプシンインヒビター活性820,000unit(713unit/g)であった。従ってトリプシンインヒビターは上清に11.9%、沈殿に88.1%の割合であった。

次に、沈殿1,000gへ水2,000gを加え沈殿させたpH4.0を維持しながらホモミキサーを用いて(4,000rpm×15分)攪拌し溶解させた後遠心分離(5,000G×10分)して上清(BBI)と沈殿(KTI)に分けた。上清(BBI)は2,767g得られ固形分14.2%、総トリプシンインヒビター力価595,000unit(215unit/g)で、沈殿(KTI)は233g得られ固形分55.8%総トリプシンインヒビター力価221,000unit(948unit/g)となった。それぞれを凍結乾燥し、以降の実験に供した。

[0035] [試験例]

・試薬の調整

KTIとBBIは製造例2で得たものを使用し、以下の実験に供した。

ウロキナーゼ、合成基質、プラスミノーゲン、プラスミンはAmerican Diagnostica 社(Greenwich, CT)より購入し、抗ERK、抗MEK1/2、抗Akt、および抗リン酸化ERK、抗リン酸化MEK1/2、抗リン酸化Akt抗体はNew England Biolabs社(Beverly, MA)より購入した。

[0036] ・培養癌細胞

マウス肺がん培養細胞3LL(中外製薬(株)製)を使用した。実験に供したマウスは

C57BL/6のブラックマウスである。ヒト卵巣癌細胞HRAはヌードマウスに移植して実験した。

[0037] ・培養液の調整法

12穴シャーレに1 (10^6) の癌細胞を入れて培養し、16時間後にシャーレに壁着した癌細胞を洗浄し新規に0.3 mlの培養液を入れた。そのときにKTIとBBIを0.1, 1.0, あるいは10 (Mとなるように同時添加した。さらに癌細胞からのウロキナーゼ産生を刺激するためにG-CSF (granulocyte-colony stimulating factor) を加えてウロキナーゼを強発現させた系でも同様の実験を行なった。24時間後に培養液を回収した。蛋白質はBio-Rad社性の蛋白質定量測定キットを使用して測定した。

[0038] [マウス肺癌細胞3LLのKTIとBBIによるウロキナーゼ産生抑制作用の評価]

培養液にサンプルバッファーを加えて電気泳動実験を行なった。このゲルの上にカゼインゲルをのせてウロキナーゼが溶解したバンドをデンストメーターで定量した。

結果を図1に示した。このバンドの溶解面積が大きいほど活性のあるウロキナーゼが多く発現していることを示す。KTIあるいはBBIを0.1, 1.0, 10 (Mの濃度で12時間添加すると、KTI添加(バンド2〜4)の癌細胞からのウロキナーゼ産生の発現は容量依存性に抑制された。しかし、BBI添加(バンド5〜7)にはウロキナーゼは発現抑制作用は認められなかった。G-CSF (0.1 (g/ml)により癌細胞を刺激してウロキナーゼ産生を促進させた場合でも同様にKTIを添加することにより(バンド9〜11)ウロキナーゼ産生の発現は容量依存性に抑制されたが、BBI添加(バンド12〜14)ではウロキナーゼ産生の発現を抑制しなかった。

[0039] [癌細胞表面に発現するウロキナーゼ活性の評価]

96穴シャーレに1 (10^4) の癌細胞を入れて培養し16時間後にシャーレに壁着した癌細胞を洗浄し新規に0.1 mlの培養液を入れた。そのときにKTIとBBIを0.1, 1.0, あるいは10 (Mとなるように同時添加した。さらに癌細胞からのウロキナーゼ産生を刺激するためにG-CSFを加えた系でも実験した。24時間後に培養液を捨ててウロキナーゼ測定用の合成基質を添加することによりパラニトロアニリンの黄色の発色をOD405 nmで測定した。

結果を図2に示した。癌細胞表面のウロキナーゼ活性はKTIにより容量依存性に抑

制された(バンド2ー4)。しかし、BBIにはウロキナーゼ活性抑制は認められなかった(バンド5ー7)。

[0040] [マウス肺癌細胞3LLのKTIとBBIによる癌浸潤抑制作用]

・癌細胞浸潤能測定

ボイデンチャンバーを用いた癌細胞浸潤アッセイのために、上段のチャンバーに10⁵個の癌細胞を入れて24時間後にフィルターの下面に移動した細胞をカウントした。KTIあるいはBBIを0.1, 1.0, 10 (Mの濃度でBoyden chamber assay法でがん浸潤の程度を評価した。浸潤能を評価するためにはフィルターに人工基底膜であるMatrigelをコートした。

結果を図3に示した。がん浸潤はKTIにより容量依存性に抑制された(バンド2ー4)。しかし、BBIにはがん浸潤抑制作用は認められなかった(バンド5ー7)。

[0041] [マウス肺癌細胞3LLのKTIとBBIによる肺転移抑制作用(Experimental metastasis)]

Experimental metastasis法とは、癌細胞を2.5 (10⁵ cells/50 (l/mouseでマウスの尾静脈から静注することにより癌細胞を強制的に血管の中に注入する方法である。標準飼料1 kgに5, 15, 50 gのKTIあるいはBBIを混ぜたものを毎日食べさせた場合の3週間後の肺転移数を比較した。

結果を図4に示した。KTI(バンド2ー4)とBBI(バンド5ー7)のいずれも肺転移は抑制されなかった。

[0042] [マウス肺癌細胞3LLのKTIとBBIによる肺転移抑制作用(Spontaneous metastasis)]

Spontaneous metastasis法とは、癌細胞を1.0 (10⁶ cells/50 (l/mouseでマウスの腹部皮下に移植した後の肺転移を見る方法である。標準飼料1 kgに5, 15, 50 gのKTIあるいはBBIを混ぜたものを毎日食べさせた場合の4週間後の肺転移数を比較した。

結果を図5に示した。KTI(バンド2ー4)のみ容量依存性に肺転移は抑制された。しかし、BBI(バンド5ー7)には肺転移抑制作用は認めなかった。

[0043] 癌細胞は皮下に移植されると、まず局所で増殖し血管新生を獲得してマウスの血管に入り、さらに血管から目的とする肺の毛細血管に接着してから肺転移を形成する。Experimental metastasisでは効果がないのにspontaneous metastasisで抑制されるということは癌細胞が血管の中に入る過程のどこかをKTIが抑制していることがわかる

。癌細胞が血管内に侵入した後はKTIによる癌転移抑制効果は低くなると考えられる。

[0044] [ヒト卵巣癌細胞HRAのKTIとBBIによる癌性腹膜炎抑制作用(Peritoneal disseminated metastasis)]

Peritoneal disseminated metastasis法とは、癌細胞を5 (10^6 cells/mouseでヌードマウスの腹腔内に投与することにより癌細胞を強制的に腹腔内に注入し、癌性腹膜炎を起こさせる方法である。標準飼料1 kgに5, 15, 50 gのKTIあるいはBBIを混ぜたものを毎日食べさせた場合の9日目の癌性腹膜炎の程度を比較した。

結果を図6に示した。KTIのみ容量依存性に癌性腹膜炎は抑制された(バンド2〜4)。しかし、BBIには癌性腹膜炎抑制作用は認められなかった(バンド5〜7)。

[0045] [マウス肺癌細胞3LLとヒト卵巣癌細胞HRAにおけるKTIとBBIによるシグナル伝達抑制作用]

・ウエスタンブロット

電気泳動した蛋白質をニトロセルロース膜に転写し、各種抗体(濃度は0.1 μ g/ml)を用いてウエスタンブロットを行なった。

癌細胞が増殖、転移するためには各種増殖因子やサイトカインという物質を利用する。今回注目している癌転移に関してはウロキナーゼによる細胞外マトリックスの破壊がもっとも重要である。今回使用した癌細胞の3LLはG-CSFによりウロキナーゼ産生が亢進することがわかっている。一方、HRA細胞に関してはTGF- β 1 (transforming growth factor- β 1)で刺激することによりウロキナーゼ産生が亢進することが確認されている。G-CSFやTGF- β 1が癌細胞の膜のリセプターに結合するとMAP kinase (MEK, ERK)やPI3 kinase (Akt)が活性化(リン酸化)されて最終的にウロキナーゼ発現が促進するという、シグナル伝達が関与している。

図7に示すように、KTIやBBIを同時投与することによりKTIのみMEK, ERK, Aktのリン酸化が抑制され(バンド2, 5, 8, 11)、結果としてウロキナーゼ発現が抑制されることが判明した。BBIにはこれらのシグナル伝達を抑制する作用は認められなかった(バンド3, 6, 9, 12)。この結果により、KTIはウロキナーゼ産生というシグナル伝達にブレーキをかけて癌転移を抑制していることが推定される。

[0046] 以上より、大豆由来KTIはマウス肺癌細胞が原発巣から血管内に侵入しようとする過程を抑制することが判った。この過程にはウロキナーゼが癌細胞周囲の結合組織を破壊して浸潤転移する過程を抑制しているものと推定される。一旦、癌細胞が血管内に侵入してしまうとその転移を抑制することは困難であった。したがって、KTIは癌細胞の初期の浸潤過程を抑制していることが確認された。

癌細胞は周囲の結合組織を酵素学的に破壊してがん浸潤が起こるものと考えられており、この酵素にはウロキナーゼやマトリックスメタロプロテイナーゼ(MMP)が重要である。KTIは癌細胞からのウロキナーゼ産生を抑制し、がん転移を止めると考えられる。

産業上の利用可能性

[0047] 医学分野では具体的には日本の癌による死亡数が男性17万人、女性11万人とすると最低でも約30万人が癌転移抑制剤の使用対象患者になると予想される。癌と共存を図るためには長期間使用し続ける必要がある。しかし、がん転移抑制剤の本来の使用方法は比較的早期がんを対象とし、がん転移を根本的に制御しようとする場合に再発の危険のある数年間、転移抑制剤を内服することが理想であると思われる。これらを総合すると50万人以上の患者が本薬剤や食品の使用対象者となるものと考えられる。

大学、研究機関のみならず製薬企業にもがん転移制御に関する研究の需要が拡大している。さらに、バイオインフォマティクス市場は、医学分野、食品業界や環境関連業界にも広がっており、バイオインフォマティクス企業の中には、環境分野の事業を行ったり、食品業界や環境関連業界への展開を視野に入れている企業も存在する。バイオインフォマティクス市場は、今後もますます拡大していくと考えられる。このような背景のもと、本薬剤の臨床応用により製薬業界の改革が起こることが予想され、さらには健康用途の食品業界の発展にまで期待できる。

図面の簡単な説明

[0048] [図1]マウス肺癌細胞3LLのKTIとBBIによるウロキナーゼ (ウロキナーゼ)産生抑制作用を示す電気泳動図及びデンストメーターによる測定値を示すグラフである。

[図2]マウス肺癌細胞3LLのKTIとBBIによる癌細胞表面のウロキナーゼ (ウロキナーゼ)活性を示すグラフである。

[図3]マウス肺癌細胞3LLのKTIとBBIによる癌浸潤抑制作用についてBoyden chamber assay法により測定したグラフである。

[図4]Experimental metastasis法によりマウス肺癌細胞3LLのKTIとBBIによる肺転移抑制作用を測定したグラフである。

[図5]Spontaneous metastasis法によりマウス肺癌細胞3LLのKTIとBBIによる肺転移抑制作用を測定したグラフである。

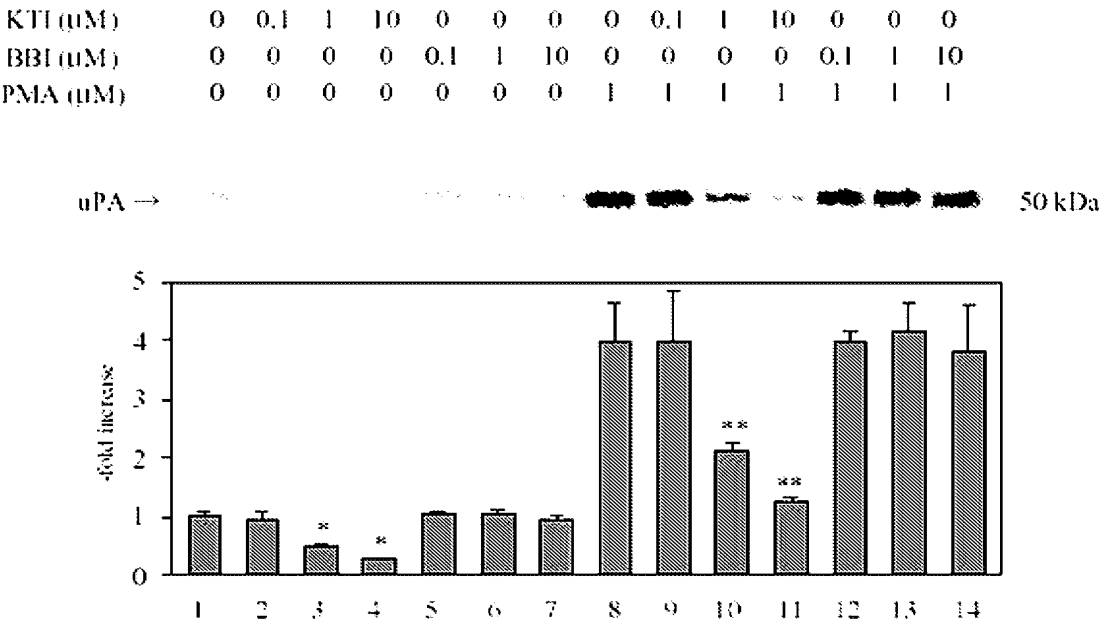
[図6]Peritoneal disseminated metastasis法によりマウス肺癌細胞3LLのKTIとBBIによる癌性腹膜炎抑制作用を測定したグラフである。

[図7]マウス肺癌細胞3LLとヒト卵巣癌細胞HRAにおけるKTIとBBIによるシグナル伝達抑制作用を示すグラフである。

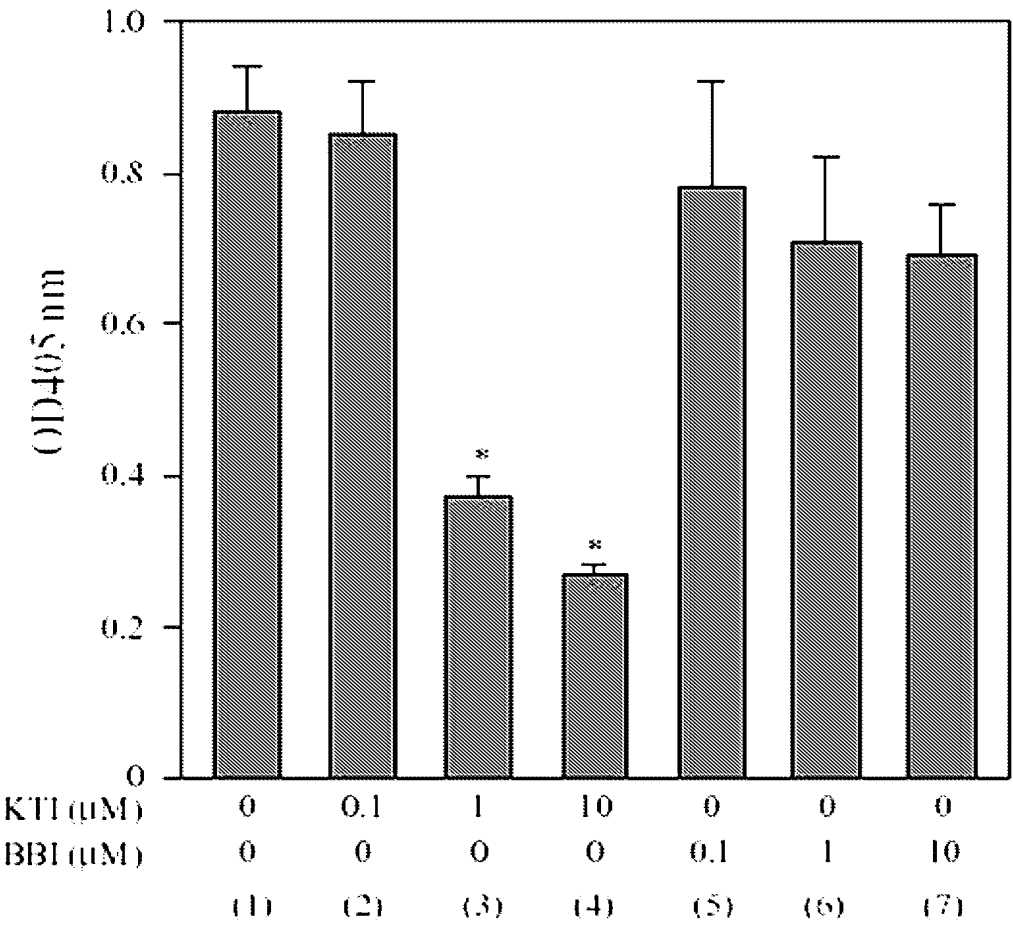
請求の範囲

- [1] 大豆クニッツ型トリプシンインヒビターを有効成分とする癌転移抑制組成物。
- [2] 大豆クニッツ型トリプシンインヒビターの供給源として大豆ホエーを含む請求項1記載の組成物。
- [3] 大豆クニッツ型トリプシンインヒビターの供給源として大豆ホエーからのトリプシンインヒビター濃縮物を含む請求項1記載の組成物。
- [4] 大豆ホエーからのトリプシンインヒビター濃縮物が、可及的にボーマンバーク型トリプシンインヒビターが分離除去されたものである請求項3記載の組成物。
- [5] 食品または医薬である請求項1記載の組成物。
- [6] 癌転移の予防もしくは抑制用と表示された食品、又は間接的表示により癌転移の予防もしくは抑制用と表示されているに等しい食品である請求項5記載の食品。
- [7] 請求項1記載の組成物に抗癌成分又は／及び癌予防成分を含む、抗癌もしくは／及び癌予防並びに癌転移抑制組成物。
- [8] 請求項1記載の組成物と、抗癌成分もしくは／及び癌予防成分を含む組成物とを組み合わせてなる、抗癌もしくは／及び癌予防並びに癌転移抑制用組合せ組成物。
- [9] 大豆クニッツ型トリプシンインヒビターの、癌転移抑制組成物製造における使用。

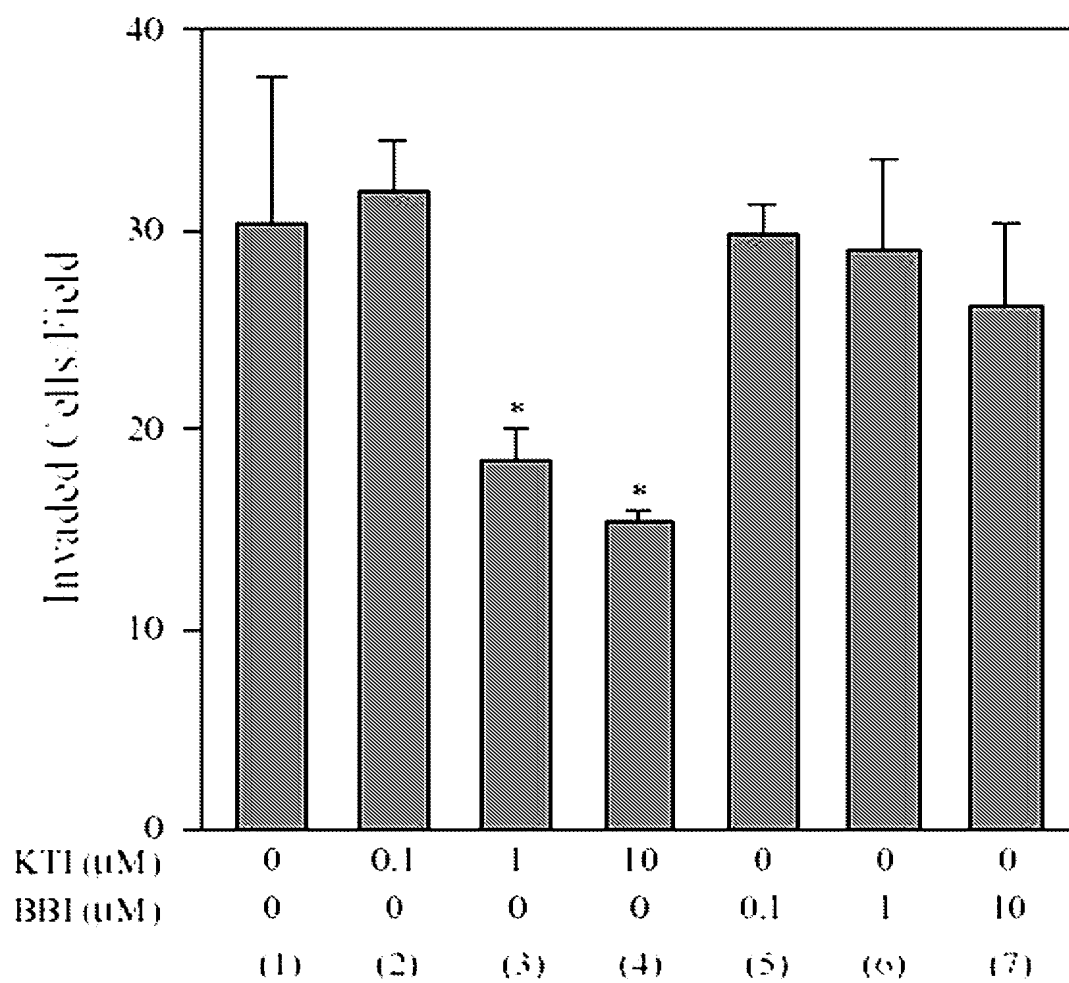
[図1]



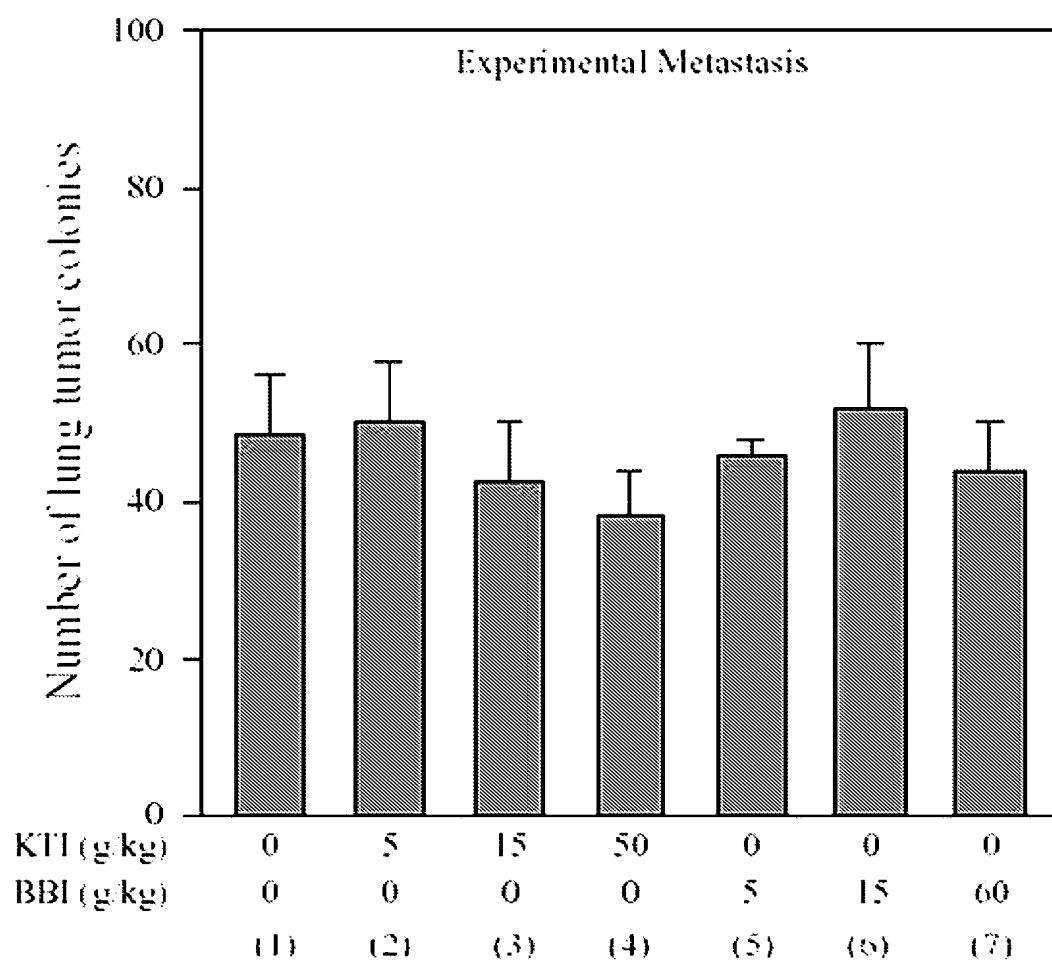
[図2]



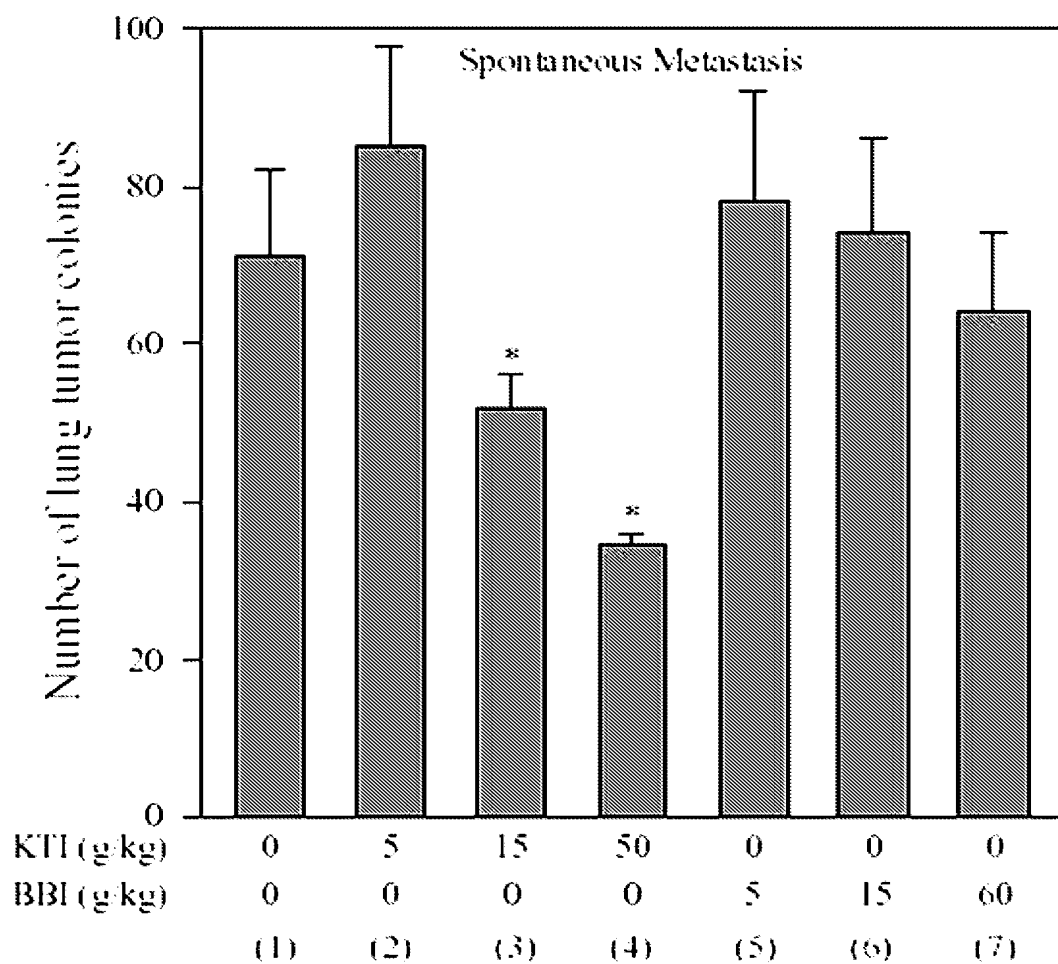
[図3]



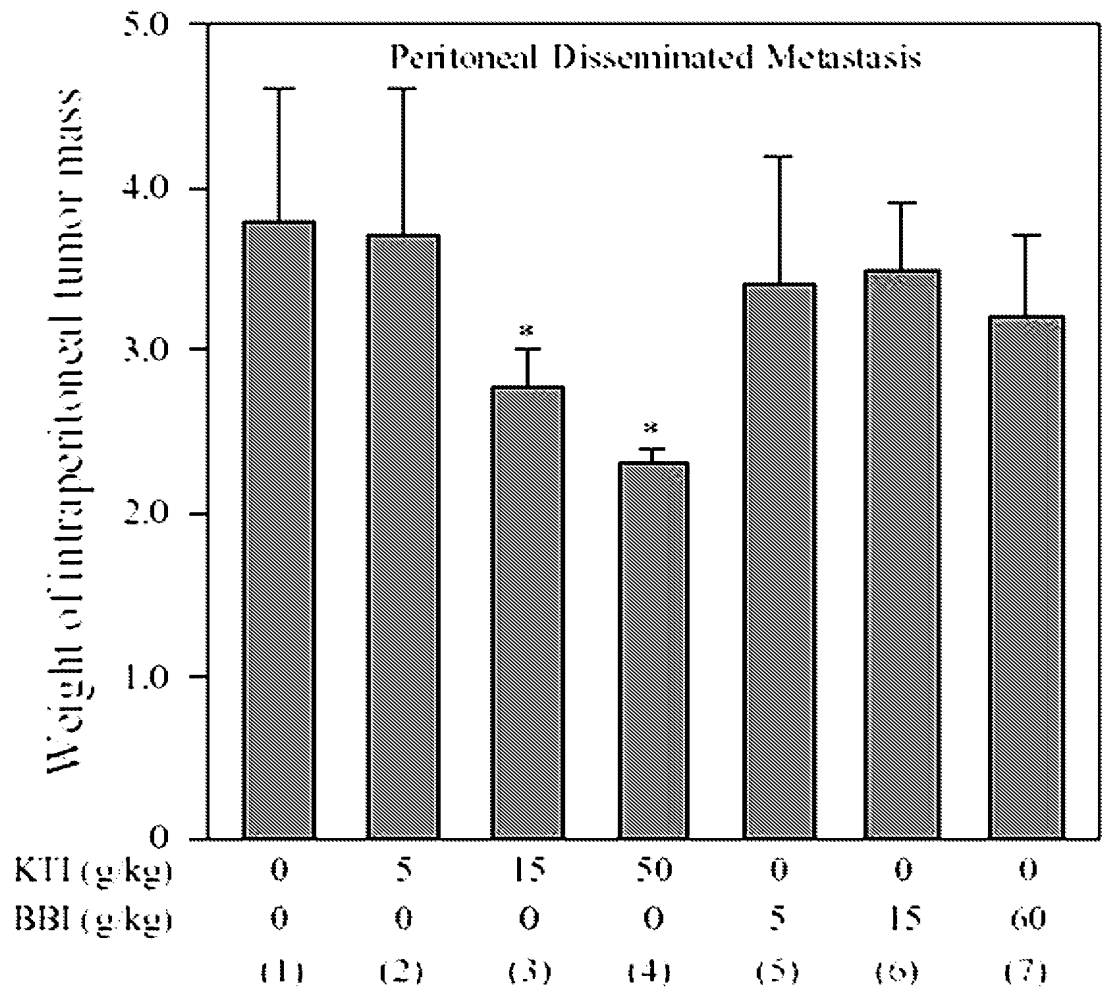
[図4]



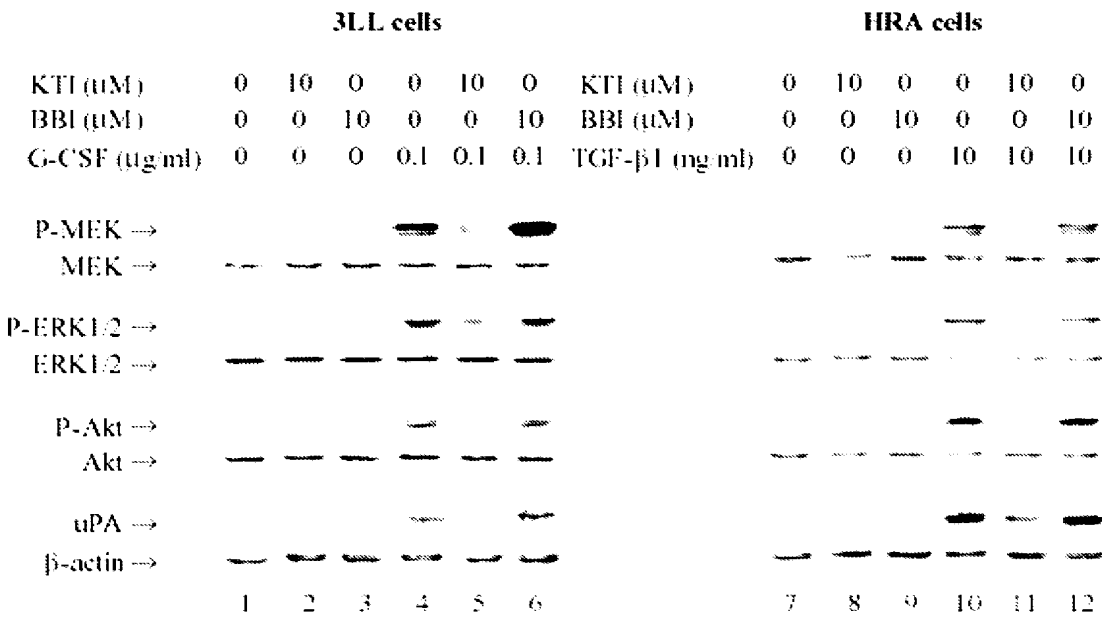
[図5]



[図6]



[図7]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/003130

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.⁷ A61K35/78, A23L1/20, 1/30, A61K38/55, 45/00, A61P35/04

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.⁷ A61K35/78, A23L1/20, 1/30, A61K38/55, 45/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2005
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2005	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2005

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS (STN), CAPLUS (STN), EMBASE (STN), MEDLINE (STN), JMEDPlus (JOIS), JSTPlus (JOIS)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Veloos, R. et al., Proteolytic activity associated with tumor growth and metastasis-Influence of trypsin inhibitor (soybean) on Ehrlich ascites tumor growth, Archives Internationales de Physiologie et de Biochimie, 1976, Vol.84, No.5, pages 1119 to 1120 (abstract) CAPLUS[on line]AN.1977: 133639, DN.86.133639	1-9
Y	Jun Wu et al., Enhanced Vascular Permeability in Solid Tumor Involving Peroxynitrite and Matrix Metalloproteinases, Jpn.J.Cancer Res., 2001, Vol.92, No.4, page 439, Fig. 9; page 448, right column line 21 to page 449, line 2	1-9



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T"

later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&"

document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

25 May, 2005 (25.05.05)

Date of mailing of the international search report

07 June, 2005 (07.06.05)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/003130

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 62-294622 A (Hiroshi MAEDA), 22 December, 1987 (22.12.87), (Family: none)	1-9
Y	JP 7-10773 A (Hiroshi MAEDA), 13 January, 1995 (13.01.95), (Family: none)	1-9
Y	JP 7-10772 A (Hiroshi MAEDA), 13 January, 1995 (13.01.95), (Family: none)	1-9
Y	JP 10-66572 A (Showa Sangyo Co., Ltd.), 10 March, 1998 (10.03.98), (Family: none)	2-4
Y	WO 97/25422 A1 (Nissin Food Products Co., Ltd.), 17 July, 1997 (17.07.97), & US 6509445 B1 & GB 2311220 A & GB 9705774 A0 & EP 890638 A2 & AU 1210797 A	1-9
Y	JP 9-100298 A (Fujimoto Seiyaku Kabushiki Kaisha), 15 April, 1997 (15.04.97), (Family: none)	1-9
Y	JP 2000-86531 A (Nippon Kayaku Co., Ltd.), 28 March, 2000 (28.03.00), (Family: none)	1-9

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl.⁷ A61K35/78, A23L1/20, 1/30, A61K38/55, 45/00, A61P35/04

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl.⁷ A61K35/78, A23L1/20, 1/30, A61K38/55, 45/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2005年
日本国実用新案登録公報	1996-2005年
日本国登録実用新案公報	1994-2005年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS(STN), Caplus(STN), EMBASE(STN), MEDLINE(STN), JMEDPlus(JOIS), JSTPlus(JOIS)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	Veloos, R et al, Proteolytic activity associated with tumor growth and metastasis-Influence of trypsin inhibitor (soybean) on Ehrlich ascites tumor growth, Archives Internationales de Physiologie et de Biochimie, 1976, Vol. 84, No. 5, pp. 1119-1120 (abstract) CAPLUS[on line]AN. 1977:133639, DN. 86. 133639	1-9
Y	Jun Wu et al, Enhanced Vascular Permeability in Solid Tumor Involving Peroxynitrite and Matrix Metalloproteinases, Jpn. J. Cancer Res., 2001, Vol. 92, No. 4, pp. 439, Fig. 9, p. 448 right column	1-9

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

25.05.2005

国際調査報告の発送日

07.6.2005

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

鶴見 秀紀

電話番号 03-3581-1101 内線 3452

4C

8415

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
	line. 21-p. 449, line. 2	
Y	JP 62-294622 A(前田浩)1987. 12. 22(ファミリーなし)	1-9
Y	JP 7-10773 A(前田浩)1995. 01. 13(ファミリーなし)	1-9
Y	JP 7-10772 A(前田浩)1995. 01. 13(ファミリーなし)	1-9
Y	JP 10-66572 A(昭和産業株式会社)1998. 03. 10(ファミリーなし)	2-4
Y	WO 97/25422 A1(日清食品株式会社)1997. 07. 17&US 6509445 B1&GB 2311220 A&GB 9705774 A0&EP 890638 A2&AU 1210797 A	1-9
Y	JP 9-100298 A(藤本製薬株式会社)1997. 04. 15(ファミリーなし)	1-9
Y	JP 2000-86531 A(日本化薬株式会社)2000. 03. 28(ファミリーなし)	1-9